

Optimización y determinación de escualeno por CG-MS en diferentes muestras biológicas

Autor

Guillermo Landa Baila

Directores

Roberto Martínez Beamonte
Teresa Sanclemente Hernandez

Ponente

Jesús de la Osada García

Facultad de Ciencias, Campus San Francisco, Universidad de Zaragoza
Curso académico 2015-2016

Índice

1. Resumen	1
Key words: Squalene, CG-MS, mediterranean diet, extra virgin olive oil.	1
2. Introducción.....	2
2.1. El escualeno	2
2.2. El escualeno en la dieta.	2
2.3. Biodisponibilidad del escualeno en humanos y en modelos animales	4
2.3.1. Ratón.....	4
2.3.2. Humano	4
2.4. Propiedades e intereses terapéuticos.....	6
2.5. La Cromatografía de Gases – Espectrometría de masas en la detección del escualeno.....	7
2.6. Justificación del trabajo	9
3. Objetivos.....	9
4. Materiales y métodos.....	10
4.1. Obtención de muestras – Datos de las muestras.....	10
4.2. Elección de estándares internos.....	10
4.3. Extracción de lípidos de las muestras.....	11
4.4. Preparación de las muestras para el cromatógrafo	12
4.5. Preparación de recta de calibrado	12
4.5.1. Método de interpolación.....	13
4.6. Condiciones del CG-MS.....	13
4.7. Establecimiento de los parámetros analíticos.....	13
4.7.1. Linealidad.....	13
4.7.2. Límite de detección	13
4.7.2. Límite de cuantificación.....	14
4.7.3. Repetibilidad.....	14
4.8. Análisis estadístico.....	14
5. Resultados y Discusión	15
5.1. Estudio del Grupo I	15
5.1.1 Establecimiento de la recta	15
Fig.7 Cromatograma del punto 0 de la recta.....	16
5.1.2 Grupo I: Muestras.....	16
5.2. Cambios en la metodología inicial.....	17
5.3. Estudios grupos II Y III.....	18
5.3.1. Nueva recta.....	18
5.3.2. Grupo II: Cromatogramas	18
5.3.3. Grupo II: Análisis estadístico	19
5.3.4. Grupo III: Cromatogramas	19
5.3.5. Grupo III: Análisis estadístico	20
5.4. Nueva mejora de la metodología y establecimiento de parámetros analíticos	20
5.5. CG-MS: Cambio de equipo	21
5.6. Parámetros analíticos	22
5.5.1. Linealidad.....	22
5.5.2. Límite de detección	22
5.5.3. Límite de cuantificación.....	22

5.5.4. Repetibilidad.....	22
6. Conclusiones.....	23
7. Bibliografía.....	24
8. Anexos	26
8.1. Anexo: Recta 2	26
8.1.1. Recta 2.1	26
8.1.2. Recta 2.2	26
8.2. Anexo: Cromatogramas representativos del Grupo II	27
8.2.1. Ratones Wildtype	27
8.1.2. Ratones KO-APOA1.....	28
8.2. Anexo: Cromatogramas representativos del grupo III	29
8.3. Anexo: Recta parámetros analíticos.....	31

1. Resumen

El escualeno es un hidrocarburo natural ($C_{30}H_{50}$) de la familia de los terpenos conocido principalmente por su papel clave como intermediario en la biosíntesis del colesterol. Su nombre es debido a su presencia en grandes cantidades el aceite de hígado de tiburón (*Squalus spp*), considerada la fuente principal de éste compuesto. No obstante, también se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, con cantidades razonables, por ejemplo, en el aceite de oliva virgen extra. Al escualeno se le han atribuido multitud de efectos beneficiosos ligados a la actividad antioxidante que parece desempeñar *in vivo*, situándose en el epicentro de la investigación nutricional, cosmética y cardiovascular, entre otras.

Este compuesto ha sido profusamente detectado y cuantificado en multitud de estudios de diferentes ramas, si bien no existe aún un método estandarizado y validado para tal fin. Nuestro trabajo parte de la necesidad del establecimiento y perfeccionamiento de dicho método, con base en la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas.

Para este trabajo se disponían de un variado catálogo de muestras de origen murino que permitieron discriminar los resultados por genotipo, dieta y sexo. Conforme se fueron obteniendo los resultados, la metodología de extracción original fue variando hasta obtener el método final, con el que se establecieron los parámetros analíticos.

Palabras clave: Escualeno, CG-MS, dieta mediterránea, aceite de oliva virgen extra.

*Squalene is a natural hydrocarbon ($C_{30}H_{50}$) from the family of terpenes, known for his key role as intermediate in the biosynthesis of cholesterol. It gets its name because of its presence in the shark liver oil (*Squalus spp*), which stands as his main commercial source by containing large amounts of it. However, squalene is also widely distributed in the rest of nature, being in reasonable amounts in, for example, the extra virgin olive oil. Many beneficial effects have been associated with the high intake of squalene due to the antioxidant activity role that appears to play *in vivo*. Because of this, squalene stands at the center of nutritional, cosmetics and cardiovascular research.*

This compound has been widely detected and quantified in numerous studies of different branches, although there is not yet a standardized and validated method for this purpose. Our work stands for the establishment and improvement of that method, betting on the gas chromatography-mass spectrometry technique.

For the development of this study there was a extense catalog of murine samples that allowed us to discriminate by genotype, diet and sex the results obtained. The original extraction methodology changed as the results were obtained until the develop of the final method. With this method the analytical parameters for the validation were established.

Key words: Squalene, CG-MS, mediterranean diet, extra virgin olive oil.

2. Introducción

2.1. El escualeno

El escualeno es un compuesto natural conocido principalmente por su papel en la ruta de síntesis del colesterol. Su nombre es debido a su presencia en el aceite de hígado de tiburón (*Squalus spp.*), que contiene grandes cantidades y es considerada la fuente más rica en este compuesto. No obstante, el escualeno está ampliamente distribuido en la naturaleza, estando presente en el aceite de oliva, el aceite de palma, el aceite de amaranto y un largo etcétera.

El escualeno ((6E,10E,14E,18E)-2,6,10,15,19,23-Hexametiltetracos-2,6,10,14,18,22-hexaeno) se trata de un hidrocarburo (C₃₀ H₅₀) con seis dobles enlaces y una estructura de isoprenoide perteneciente a la familia de los terpenos, similar al betacaroteno. Como metabolito intermediario, toma parte en todas las rutas de biosíntesis de esteroides en todas las plantas y animales. Existen muchísimos compuestos similares estructuralmente al escualeno que toman parte en funciones biológicas críticas, como la vitamina A, ubiquinona (Q10), vitamina E, vitamina K, etc.

Tabla 1 - Propiedades físicas y químicas del escualeno

Propiedad	Valor
Peso Molecular	410.7 g mol ⁻¹
Punto de fusión	-75 °C
Índice refracción	1.499
Viscosidad (25°C)	12 cP
Densidad	0,858 g/ml
Punto de ebullición	285 °C
Tensión superficial	~32 mN/m

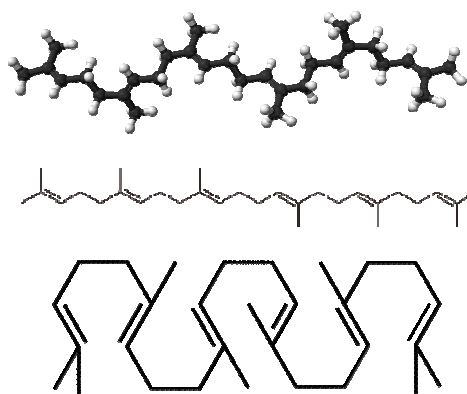


Fig1. Representaciones gráficas del escualeno

2.2. El escualeno en la dieta.

Hace años, estudios epidemiológicos señalaron que la dieta que compartían el conjunto de países del litoral mediterráneo se asociaba a una menor incidencia de varias patologías muy presentes en otros países occidentales, tales como el infarto de miocardio, la diabetes, dislipemias, cáncer, etc. (Ortega, 2006) Ésta dieta (mediterránea) contiene aceite de oliva, pescado, fruta, verdura y frutos secos, entre otras cosas.

El aceite de oliva se reconoció como el responsable de las acciones beneficiosas de este estilo nutricional, siendo la principal fuente de grasa de ésta dieta y evidenciándose que su consumo continuado tenía efectos preventorios en el cáncer de colon y de mama, en la enfermedad de coronaria y en la respuesta inmunológica e inflamatoria (Baldioli *et al*, 1996).

En un principio, se pensó que su poder radicaba en su alto contenido en grasas monoinsaturadas, entre ellas el ácido oleico. La hipótesis de que el alto contenido de este ácido graso (72%) en el aceite de oliva era el responsable de sus propiedades fue descartada debido a que éste se encuentra también en cantidades considerables en la grasa de pollo (22-53%), así como en otros aceites como el de maíz, soja y girasol (23-50%). Estas grasas y aceites ricos en ácido oleico no solo no comparten las propiedades beneficiosas del aceite de oliva virgen si no que están asociados al incremento del riesgo de padecer cáncer de mama y colon en humanos. En detrimento del oleico, asoma un gran espectro de otros componentes candidatos a ser responsables de las propiedades del aceite de oliva, tales como fitoesteroles, compuestos fenólicos, terpenos, alfa tocoferol y el escualeno, entre otros.

El contenido de escualeno en el aceite de oliva virgen varía entre 1,5 g/kg y 9,6 g/kg, dependiendo de la especie. En una dieta con un consumo abundante de aceite de oliva, la ingesta de escualeno puede situarse en torno a los 200-400 mg/día, tal y como se ha observado en países mediterráneos (Ramírez-Torres *et al*, 2011). Una cantidad considerablemente superior al consumo medio observado en los Estados Unidos (30 mg/día).

Por otro lado, tal y como adelantábamos, la principal fuente de escualeno no es el aceite de oliva si no el aceite de hígado de tiburón: En él las concentraciones pueden variar entre los 9 y los 816 g/kg dependiendo de la especie (Heller *et al*, 1957). Este aceite es un importante componente de la dieta japonesa, un régimen nutricional también asociado a una baja incidencia de las enfermedades cardiovasculares. Por ello, el escualeno se postula como el compuesto que podría relacionar ambas dietas (mediterránea y japonesa), reafirmandose así en su naturaleza beneficiosa para la especie humana.

El aceite de amaranto también constituye una gran fuente de este compuesto (24-80 g/kg), así como el aceite de argán (3 g/kg).

El interés en este compuesto se enmarca en una larga investigación científica en marcha desde los años 60. Un enorme número de trabajos, investigaciones y publicaciones han descubierto y clasificado sus efectos beneficiosos en muchos sistemas biológicos, así como sus potenciales aplicaciones para la industria farmacéutica. Actualmente, es usado como un componente muy importante de los protectores solares y de las cremas cosméticas, debido a sus propiedades antioxidantes. También ha sido utilizado como adyuvante para vacunas tales como la de la gripe y el paludismo debido a su capacidad de producir una liberación particulada del antígeno y aumentar la inmunogenicidad de la administración.

2.3. Biodisponibilidad del escualeno en humanos y en modelos animales

La biodisponibilidad describe la fracción de la cantidad de escualeno administrada por la dieta que alcanza la circulación sistémica. La biodisponibilidad de un compuesto como éste es necesaria para la manifestación de su acción biológica y el estudio de sus propiedades in vivo.

2.3.1. Ratón

En este animal, la absorción del escualeno de dieta es ligeramente inferior a la del colesterol, siendo un 42 % frente a un 48%. El escualeno absorbido es convertido en esteroides durante el tránsito intestinal, lo que sugiere que el escualeno estimula la biosíntesis de colesterol en el intestino (Tiblis *et al*, 1978). Por otro lado, este proceso es inhibido por el colesterol en la dieta, lo que indica que la dieta es importante en la regulación del metabolismo del escualeno. Además, en determinadas células del intestino también tiene lugar la biosíntesis del mismo, por lo que la concentración de escualeno sérica tendría tanto un origen exógeno (dieta) como endógeno (Strandberg *et al*, 1981).

El escualeno absorbido en la dieta contribuye al incremento de las concentraciones de colesterol en el hígado y plasma, evidenciado por la elevada presencia de precursores en las VLDL. Cuando la biosíntesis del colesterol está estimulada por el escualeno en la dieta, el escualeno absorbido transformado en ácidos biliares. Por otro lado, la actividad de la HMG-CoA reductasa es inhibida por un sistema de retroalimentación negativa al aumento de la concentración de precursores. En una dieta con 1% de escualeno, la HMG-CoA es fuertemente inhibida, mientras que se estimula la actividad de la Coenzima A colesterol aciltransferasa (Tiblis *et al*, 1982).

El escualeno administrado por vía intravenosa es rápidamente eliminado y degradado en el hígado. (A. Ramírez-Torres *et al*, 2011).

2.3.2. Humano

a. Absorción: Tras una ingesta que contenga 1,5 mg de escualeno, el escualeno absorbido aparece en la circulación transportado por los quilomicrones y en las VLDL. La concentración sérica postprandial de éste alcanza su máximo a las ocho horas, retornando a los niveles basales al cabo de las 24 horas (Rajaratman *et al*, 1999). Aproximadamente un 70 % del escualeno de la dieta es absorbido, y un 80-90% de ese escualeno es transportado por el plasma sanguíneo en asociación con lipoproteínas. Tras la absorción, hay un incremento en la síntesis del colesterol y un aumento en los niveles de precursores de éste en los quilomicrones, lo que sugiere que parte del escualeno absorbido es convertido en colesterol en las células de la mucosa intestinal (Relas *et al*, 2000).

La disminución de los niveles del escualeno en los quilomicrones es más lenta que la de los triglicéridos, el campesterol o la vitamina A, manteniéndose en la circulación tras la lipólisis. Su disipación se ha demostrado que es independiente del nivel de colesterol absorbido, por lo que el escualeno se convierte en un potencial marcador para el estudio del perfil de las lipoproteínas intestinales postprandiales (Ramírez-Torres, A *et al*, 2011).

b. Almacenamiento y metabolismo: El hígado es el órgano principal en el que el escualeno es almacenado. Este almacenamiento se divide en dos partes: Una pequeña reserva metabolitamente activa donde el escualeno participa en la síntesis del colesterol y otra reserva metabolitamente inactiva, mucho más grande, donde el escualeno es propiamente almacenado. En un hombre adulto de 70 kg, el hígado contiene aproximadamente 2,6 g de escualeno, donde 300 mg corresponden a la reserva metabolitamente activa. En el hígado, la relación escualeno/colesterol es de 6,5 µg/mg (Goodman *et al*, 1969).

La ingesta crónica de 1 g/día de escualeno causa un incremento en la concentración de colesterol y precursores del colesterol, pero la ingesta de 0,5 g/día no tiene ningún efecto sobre individuos hipercolesterolémicos. Esto podría sugerir que la actividad HMG-CoA reductasa es inhibida por un sistema de retroalimentación negativa ante un aumento de la síntesis del colesterol derivada de la ingesta de escualeno (Miettinen *et al*, 1969). Esta consideración valoraría un papel del escualeno a modo de estatína, algo muy interesante de cara a la investigación cardiovascular.

Si bien el un incremento del colesterol inhibe la acción del receptor de la LDL, la síntesis moderada de colesterol derivada de la ingesta de pequeñas cantidades de escualeno en la dieta podría ser equilibrada por una inhibición suficiente de la HMG-CoA por parte de éste mismo, por lo que no se incrementaría la concentración hepática y sérica de colesterol (Ramírez-Torres, A *et al*, 2011).

c. Escualeno sérico y transporte: La concentración sérica o plasmática del escualeno en humanos varía entre 1.9 y 34 µg/dl. Esta concentración depende de la respuesta del individuo a los lípidos en la dieta, la fuente del escualeno, los niveles variables de síntesis endógena del mismo y del momento del día (se han observado picos de concentraciones durante la noche) (Rajaratman *et al*). De igual manera, diferentes condiciones patológicas o psicológicas del individuo pueden alterar estos niveles. Un 30-50% del escualeno es transportado por VLDL, un 30-45% por LDL y un 15% por HDL. De nuevo, estos valores pueden variar por la condición patológica del individuo (Miettinen *et al*, 1969).

El escualeno sérico representa el equilibrio entre la producción del escualeno y la conversión de este a precursores del colesterol. Por ello, no son pocos los estudios que han apostado por el escualeno como un indicador cualitativo de cambios en el metabolismo del colesterol. Bajo circunstancias de hipercolesterolemia como la obesidad o el síndrome metabólico en la diabetes tipo 2, el escualeno -al igual que

otros precursores del colesterol- se acumula y su nivel sérico se incrementa (Simonen *et al*, 2007).

d. Distribución: El escualeno no solo se almacena en el hígado: Esta ampliamente distribuido en varios tejidos. Entre ellos, el tejido adiposo es el que muestra las más altas concentraciones, siendo el segundo tejido del cuerpo con más nivel de escualeno en el cuerpo y siendo capaz también de biosintetizarlo (Tilvis *et al*, 1978). Casi la totalidad del escualeno en el tejido adiposo esta localizado en los adipocitos, donde un 80% se encuentra en el adiposoma principal y un 20 % en la membrana de los microsomas. Esta distribución dual, al igual que en el hígado, corresponde a una parte pequeña metabolitamente activa donde el escualeno es sintetizado y una parte metabolitamente inactiva que corresponde al almacenamiento (Tilvis *et al*, 1982).

La transferencia intracelular del escualeno sintetizado de novo a los adiposomas aún no esta clara, pero el metabolismo del escualeno en el tejido adiposo muestra mecanismos específicos de regulación diferentes al del hígado.

e. Eliminación:

La principal vía de excreción del escualeno es la biliar. Los niveles de escualeno biliares son superiores a los niveles en plasma en individuos que sigan una dieta con ausencia de escualeno, lo que es indicativo de la síntesis endógena del mismo (Liu *et al*, 1975). No obstante, las pequeñas cantidades de este compuesto observadas en la orina y en las heces indican una eficaz reabsorción del escualeno biliar (Tilvis *et al*, 1982).

Una gran cantidad del escualeno es excretado por la piel, donde jugaría un papel protector. No obstante, este escualeno provendría de la síntesis de novo en ella y no de la circulación (Liu *et al*, 1975).

La leche humana también constituye una vía de eliminación del escualeno a un nivel correlacionado con el del colesterol (Ramirez-Torres, A *et al*, 2011)

2.4. Propiedades e intereses terapéuticos

Como adelantábamos en el punto 2.2, el alto consumo de aceite de oliva virgen es conocido por ofrecer una considerable protección frente a enfermedades tales como el cáncer (colon, mama, piel...) y la enfermedad de coronaria debido presumiblemente a su alta concentración de compuestos tales como el escualeno, alfa tocoferol y otros antioxidantes.

Debido a la alta acumulación de escualeno en la piel, puede que su mayor efecto protector sea la de evitar el cáncer de ésta misma. Se ha demostrado que sobre la superficie de la piel y bajo la exposición de luz solar, es un eficiente recolector de especies reactivas de oxígeno, protegiendo de ese modo la piel de la peroxidación lipídica debida a la exposición a rayos UV y otras fuentes de radiaciones ionizantes

(Huang *et al*, 2009). En la piel, también podría actuar como una especie de limpiador de compuestos xenobióticos.

También, en diversos experimentos con ratones que seguían una dieta suplementada con escualeno, se observaba que mejoraba la salud mitocondrial y el sistema de defensa antioxidante a nivel hepático. Esta mejora se debería a la inhibición de la peroxidación de lípidos mitocondriales y al incremento de los niveles de glutatión reducido y de las enzimas antioxidantes glutatión-dependientes (Buddhan *et al*, 2007). Esto apunta a que escualeno como suplemento dietético podría ser un eficiente agente terapéutico para paliar la aparición de trastornos asociados a la edad directamente relacionados con el aumento del estrés oxidativo.

Existe la evidencia de que los inhibidores de la HMG-CoA reductasa (estatinas), podrían afectar las etapas iniciales del desarrollo de la aterosclerosis, reduciendo el estrés oxidativo e inhibiendo la acción de la fosfolipasa D y la proteína quinasa C (Yatsunari *et al*, 2001). El escualeno, considerando su posible papel como estatina, podría contribuir a estos efectos positivos preventorios. No obstante, diversos experimentos han demostrado que el escualeno no tiene efecto en la aparición de especies reactivas de oxígeno en los macrófagos cuya transformación resulta en las células espumosas (Moreno *et al*, 2003), por lo que se ha apuntado a una posible tejido-especificidad del escualeno en su papel antioxidante.

2.5. La Cromatografía de Gases – Espectrometría de masas en la detección del escualeno

La cromatografía de gases es una técnica que tiene la capacidad de separar los compuestos de una mezcla muy compleja. En ella, la muestra líquida se volatiliza y se inyecta a través de una columna de cromatografía. Los compuestos presentes en la mezcla eluyen de la columna a diferentes tiempos (Tiempos de retención de cada compuesto) reportando una señal en forma de pico, con una altura y un área determinadas por la cantidad del compuesto. En la técnica de la cromatografía de gases tradicional, tras el análisis se obtiene un cromatograma. El cromatograma es la representación gráfica de todos los picos que el detector ha reportado al paso de los distintos compuestos en función del tiempo. Una vez separados y detectados los compuestos, el único dato del que se dispone para la identificación de los mismos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Este dato no es suficiente para una identificación inequívoca, sobre todo cuando analizamos muestras con un número elevado de componentes.

Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar con muchísima exactitud cualquier sustancia si está pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes. Por lo tanto, la asociación de las dos técnicas, GC (Gas Chromatography) y MS (Mass Spectrometry) da lugar a una técnica combinada GC-MS que permite la separación e identificación de compuestos en mezclas complejas.

El escualeno ha sido profusamente detectado de manera cualitativa en numerosos estudios.

No obstante, se cuente con MS acoplada o no, la cromatografía por si sola no sirve para cuantificar la concentración de un compuesto de interés en una mezcla, y el escualeno no es una excepción. Para ese fin existen varias técnicas disponibles, como la normalización de áreas, el método de patrón externo o el método de patrón interno, siendo este último el más utilizado por su exactitud.

Para el desarrollo del método del patrón interno el procedimiento es el siguiente:

1. Preparar una serie de diluciones a concentraciones crecientes del compuesto que queremos cuantificar. El intervalo de concentraciones ha de ser similar a la concentración del compuesto en las muestras de las que pretendamos cuantificar su concentración. Estas preparaciones servirán para hacer una recta de concentraciones.
2. Añadir a cada una de las preparaciones y a la muestra una misma cantidad o concentración de estándar interno. El estándar interno ha de ser un compuesto de naturaleza similar al compuesto a cuantificar, pero que no esté presente en la muestra.
3. Inyectar el mismo volumen en el cromatógrafo las preparaciones, así como la muestra. De esta forma se obtendrán los cromatogramas de las preparaciones que nos servirán para realizar una recta patrón

Con este método obtenemos una recta que nos relaciona las concentraciones con el área obtenida en el cromatógrafo. De esta forma podemos interpolar los valores del área del compuesto de interés y determinar su concentración en la muestra. De igual manera, al añadir estándar interno a la muestra a una concentración conocida, podemos calcular el rendimiento de la extracción de cada muestra procesada.

Son varios los estándares internos que se han empleado en estudios de cuantificación de escualeno en muestras: El Octadecilbenzeno ha sido usado como estándar interno en cromatografía de líquidos de alta definición y se obtuvo una buena linealidad (Matsuura *et al* 2012). Para cromatografía de gases, se ha usado sitosterol, lathosterol y colesterol marcado con deuterio para la cuantificación de varios esteroides presentes en una muestra de forma simultánea. No obstante, el más utilizado hasta ahora para éste propósito ha sido el escualano. Este compuesto ($C_{30}H_{76}$) se trata de un derivado del escualeno obtenido por la completa hidrogenación del mismo. Si bien su estructura es muy similar a la del escualeno, el escualano no está presente en la

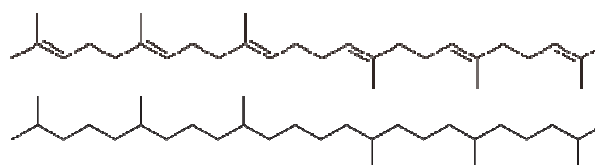


Fig.2 Escualeno y escualano

naturaleza. Por otro lado, el tiempo de retención es diferente al del escualeno, lo que permite la fácil diferenciación entre ambos compuestos en el cromatograma, así como en el espectrómetro de masas, al tener un peso molecular y un patrón de fragmentación diferente. Estudios de cuantificación del escualeno y esteroides han sido

llevados a cabo con este compuesto como patrón interno, obteniendo una buena linealidad (de la Osa *et al*, 1995).

2.6. Justificación del trabajo

Son muchos los motivos por los cuales un método de cuantificación de escualeno en muestras biológicas resultaría interesante e innovador.

Tal como adelantábamos en el punto 2.3.2.a, la disminución de niveles de escualeno tras la ingesta, parecen independientes de los niveles de colesterol absorbidos (Rajaratman *et al*), por lo que su detección y cuantificación sérica podría ser un muy útil marcador de los niveles de lipoproteínas. De igual manera, hablábamos como el escualeno podría actuar a modo de estatina, por lo que su detección en alimentos y la monitorización de sus niveles en suero podría ser una muy buena base para un tratamiento de enfermedades basadas en la alteración del metabolismo del colesterol.

No obstante, la detección y cuantificación de este compuesto por CG-MS no es algo nuevo. Como veníamos diciendo en el punto 2.5, no son pocos los estudios que han desarrollado métodos de cuantificación del escualeno con más o menos éxito, tanto en aceites vegetales como en muestras humanas. No obstante, se tratan de estudios aislados y escasos en el uso de muestras de origen murino, el modelo animal por excelencia. La detección y cuantificación del escualeno en muestras de este animal sería de especial interés, dado que facilitaría el desarrollo de estudios centrados en sus propiedades beneficiosas sobre modelos animales de enfermedades humanas, tales como el ratón Knock-Out para APOE.

Nuestro estudio parte de la necesidad del establecimiento y la validación de un método fiable y reproducible para la detección y cuantificación del escualeno.

3. Objetivos

El objetivo inicial de nuestro trabajo fue desarrollar y perfeccionar un método semi-cuantitativo que permitiera detectar la presencia y aproximar la concentración de escualeno por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en muestras biológicas.

Este objetivo se subdividió en tres objetivos específicos que se abordaron simultáneamente:

- Desarrollar un método de tratamiento de la muestra biológica que permitiera la extracción de lípidos insaponificables de una forma eficaz, rápida y sencilla, y que permitiera la detección del escualeno por CG-MS en las mismas.
- Desarrollar un sistema de interpolación basado en el método del estándar interno para la cuantificación de escualeno en las muestras.

- Establecer los parámetros analíticos necesarios para la validación del método: Linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, repetibilidad y recuperación.

4. Materiales y métodos

4.1. Obtención de muestras – Datos de las muestras

Para el desarrollo de este trabajo se disponía un gran número de muestras de origen murino. Éstas se trataban en su totalidad de hígados ultracongelados provenientes de ratones catalogados en tres grupos principales:

- Grupo I: Ratones Knock-out para APOE (C57BL/6J), 20 machos y 22 hembras, con individuos control alimentados con dieta western e individuos alimentados con la misma dieta suplementada con 50 mg/kg de escualeno.
- Grupo II: Ratones Knock-out para APOA1 (C57BL6/J), 14 machos y 15 hembras, con individuos alimentados con dieta chow e individuos con la misma dieta suplementada con escualeno (1g/Kg día). Dentro de este grupo también se incluían 13 muestras obtenidas de ratones macho wildtype divididos entre dieta control y dieta suplementada con escualeno.
- Grupo III: 41 Ratones Knock-out para APOE, todos machos. Un grupo de ellos (control) había sido alimentado con dieta chow, otros dos grupos con la misma dieta suplementada con escualeno 0,25 mg/kg día y 1g/kg día respectivamente.

Con estas muestras se pretendía discriminar por sexo, dieta y genotipo. La dieta Chow es una dieta estándar para roedores de laboratorio mientras que la dieta western tiene un 20% mas de aceite de palma y 0,15% más de colesterol con respecto a ésta última.

4.2. Elección de estándares internos

Para nuestro estudio se barajaron dos compuestos para ser el estándar interno: El escualano y el 5 α -colestano.

El 5 α -colestano se usa como precursor en la síntesis artificial de esteroides, no esta presente en la naturaleza y tiene un peso molecular y un tiempo de retención próximos al escualeno.

Finalmente, con estudios anteriores como referentes (George C. et al.) se eligió usar los dos: El escualano sería el estándar interno primario, el cual se añadiría antes de la extracción a una concentración conocida para

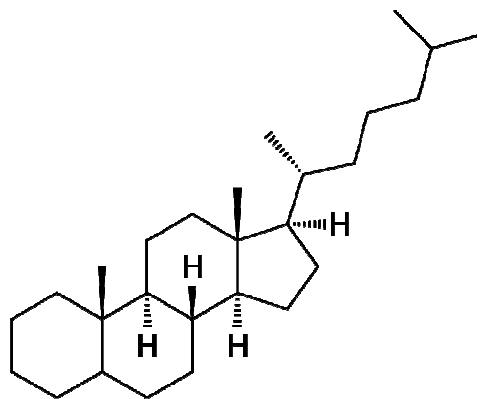


Fig.3 5 α -colestano

posteriormente calcular el rendimiento del método. Por otro lado, el 5 α -colestano sería el estándar interno secundario, el cual añadiríamos tras la extracción y con el que calcularíamos el rendimiento de la inyección del aparato en cada una de las muestras. De esta manera, obtendríamos el rendimiento global del método, además de dos patrones sobre los que basar la cuantificación.

Se adquirieron ambos estándares de la casa comercial Sigma Aldrich: SQUALENE $\geq 99\%$ CAS: 111-01-3 y el 5 α -CHOLESTANE $\geq 97\%$ CAS: 481-21-0.

4.3. Extracción de lípidos de las muestras

La extracción se realizaba en lotes de 6 muestras. Éstas se tomaban del congelador de -80 °C donde se almacenaban (Vip Series -86°C Sanyo MDF-U71V) y se llevaban en una caja con hielo seco a la sala de pesado. En una balanza de precisión (Metler toledo New classic MF ML204), se pesaba una cantidad de muestra aproximada a 0,1 gramos. El valor del peso exacto se apuntaba para después calcular con exactitud los parámetros de concentración, rendimiento y recuperación.

Las muestras eran homogeneizadas en 2 ml de PBS usando un tubo Potter y un vástago. Los homogeneizados se trasvasaban a tubos individuales de centrifuga de 10 ml y se les añadía 0,5 μ l del estándar interno primario (escualano) puro. Tras cada proceso de homogeneizado, el Potter se lavaba dos veces con 2 ml de hexano (CHROMASOL® $\geq 97.0\%$ (GC), 34859-1L) cada vez. Estos lavados se recogían en el mismo tubo de centrifuga donde se había depositado el homogeneizado de la muestra correspondiente. Con estos lavados se pretendía disolver cualquier resto lipídico que pudiera quedar en tubo tras el homogeneizado, con el fin de obtener resultados mas precisos y evitar la contaminación cruzada entre las muestras.

Los tubos se centrifugaban 10 minutos a 2200 rpm en una centrífuga (Eppendorf centrifuge 5804), con lo que se obtenían dos fases: Una fase superior orgánica con hexano donde presumiblemente estarían todos los lípidos y compuestos orgánicos de interés y una fase inorgánica de pbs. Tras extravasar la fase orgánica de cada tubo a otro, se añadían 2 ml de hexano a la fase orgánica, se mezclaba bien en un vortex y se repetía la centrifugación con las mismas condiciones. Nuevamente, se extravasaba la fase orgánica, se añadían 2 ml de hexano al tubo y se centrifugaba, habiendo tres centrifugaciones en total. Las muestras se almacenaban en un congelador a -32°C (Congelador vertical Liebherr GN3023).

4.4. Preparación de las muestras para el cromatógrafo

Para la cromatografía de gases interesaba que las muestras tuvieran el menor nivel de impurezas de carácter lipídico posible. Por ello, se pasaba cada una por una columna individual de silica gel (Análisis vínicos, columna EFS SiOH 3/200 pK). Las columnas se estabilizaban con 1 ml de hexano antes de pasar las muestras. Cuando éstas habían pasado y se habían recogido en nuevos tubos, se hacían dos lavados de la columna con 1 ml de hexano cada vez, para eluir toda la muestra.



Fig. 4 Muestras pasando por columnas

Posteriormente, los extractos filtrados se llevaban a sequedad con un flujo de N₂ en un baño de 60 °C, en una campana de extracción. Las muestras se resuspendían en un volumen final 200 µl de un stock de diclorometano (CROMASOLV® ≥99.8%,



Fig.5 Muestras llevándose a sequedad

34856-1L) con el estándar interno secundario (5alfa-colestano) a una concentración de 0,8979 mM. Se lavaban bien las paredes del tubo y se extravasaban a viales de inyección de 2ml con un septum de butil PTFE e insertos reductores de 0,1 ml. La cantidad exacta de stock en el que se resuspendían se medía por pesada en una balanza de precisión para después calcular la cantidad exacta del diclorometano y la concentración de los estándares.



Fig.6 Muestras listas para el cromatógrafo

4.5. Preparación de recta de calibrado

De acuerdo al método del patrón interno se realizaron una serie de preparaciones para establecer una recta a partir de la cual interpolar las áreas del cromatograma y obtener la cantidad de escualeno en las muestras: Se prepararon 10 diluciones seriadas a la mitad de escualeno comercial (S3626 Sigma ≥98%) en diclorometano, desde 10mM hasta 0mM. Las concentraciones de los estándares internos permanecían constantes en todos los puntos de la recta.

4.5.1. Método de interpolación

Para la obtención de la recta patrón se representaba la concentración de escualeno (y) frente al cociente de las áreas obtenidas del escualeno y del estándar interno primario (x). Con la fórmula obtenida se podía obtener la concentración de escualeno únicamente sustituyendo con el cociente de las áreas correspondientes obtenidas en el cromatograma de la muestra.

4.6. Condiciones del CG-MS

Las muestras se pasaron por un cromatógrafo de gases-masas modelo VARIAN CP-3800/VARIAN SATURN 2200. Las condiciones del proceso fueron:

- Columna: HP-5ms ULTRA INERT – GCMS Column Agilent 19091S – 433 UI 30m x 250um x 0.25um.

- Condiciones de la columna:

Tª	Rate	Hold	Total
100 °C		5	5
280 °C	60	10	18

- Inyección: 300°C

- Muestra: 1uL autosampler. Split 1-20"

4.7. Establecimiento de los parámetros analíticos

Para la validación de un método es necesario el establecimiento de los parámetros analíticos que acoten las condiciones en las que éste es fiable.

4.7.1. Linealidad

Se preparó una nueva recta basada en 12 diluciones seriadas a la mitad, de 40 mM a 0. Se añadieron 2 nuevos puntos para comprobar la linealidad en el límite superior.

4.7.2. Límite de detección

El LD se considera habitualmente como la concentración mínima de sustancia que puede ser detectada con fiabilidad por el método, o como la menor cantidad de un compuesto cuya señal puede ser distinguida de la del ruido. Por ello, el LD será la concentración mínima obtenida a partir de la medida de una muestra (que contiene el compuesto) que seamos capaces de discriminar de la concentración obtenida a partir de la medida de un blanco. Se calcula como la “media señal blanco” + 3*desviación estándar del blanco.

4.7.2. Límite de cuantificación

El límite de cuantificación se define como la magnitud mínima que puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud. Se calcula como la “media señal blanco” + $10 \times$ “desviación estándar del blanco”.

4.7.3. Repetibilidad

La repetibilidad se define como la proximidad y concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas de una misma muestra bajo las mismas condiciones. Ésta puede ser expresada en términos de la dispersión o la variancia de los resultados. Para su cálculo se prepararon 6 muestras dopadas con escualeno, tres de ellas a 0,25 mM y las otras tres a 2,5 mM. Todas las muestras se prepararon a partir de un solo homogeneizado que se fraccionó en 6 muestras parciales, las cuales se doparon con las concentraciones específicas descritas.

4.8. Análisis estadístico

Obtenidas todas las concentraciones de las muestras de forma individual, para el análisis estadístico de los grupos muestrales se usó el programa GraphPad Prism 5. Para observar las diferencias significativas, se utilizó ANOVA de una vía con post-test de Mann-Whitney de una cola, considerando diferencias significativas un valor de $P < 0,05$, y muy significativas con un valor de $P < 0,001$.

5. Resultados y Discusión

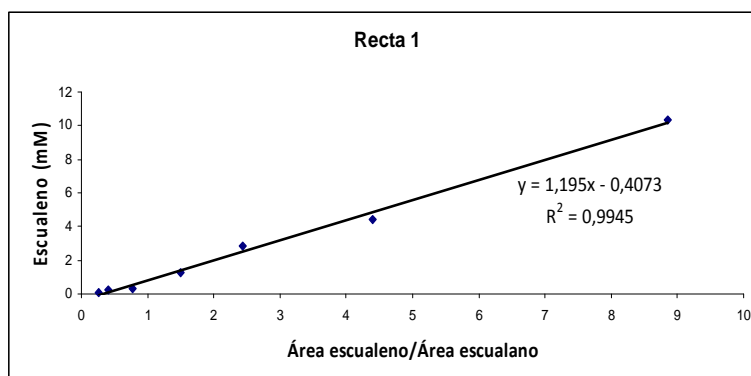
5.1. Estudio del Grupo I

El estudio del grupo I fue el único realizado siguiendo la metodología original descrita en el apartado 4, Materiales y métodos. Considerando los resultados obtenidos se introdujeron cambios con el fin de perfeccionar el método, los cuales comentaremos mas adelante.

5.1.1 Establecimiento de la recta

En primer lugar se pasó por el cromatógrafo las preparaciones de la recta para el método del patrón interno. Los cromatogramas de estas preparaciones fueron los primeros obtenidos y en ellos se observaron tal y como se esperaba los picos correspondientes al escualano (tiempo de retención de 11,2 minutos), al escualeno ($t_R=12,6$ minutos) y al 5 alfa ($t_R=13,3$ minutos). Los datos de las áreas obtenidas sirvieron para el establecimiento de la recta tal y como se ha explicado en el punto 4.4.

Área E/Área Escualano	Escualeno (mM)
8,8492462	10,326352
4,3972665	4,4009539
2,432618	2,8458183
1,4947538	1,2341518
0,7808064	0,3257659
0,4089419	0,1980652
0,2687153	0,0844961

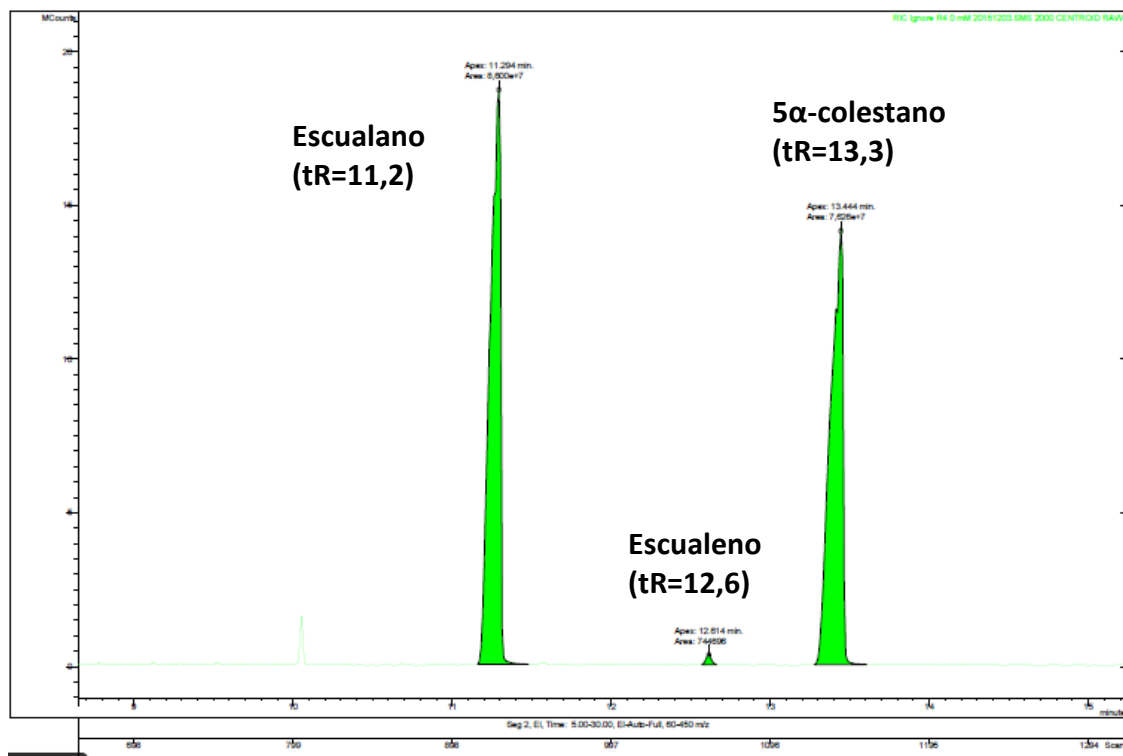


La linealidad fue aceptable pero se atendió a una sorpresa grave: El cromatograma del punto 0 de la recta, en la cual no se había añadido de escualeno comercial, se observó un pico con un tiempo de retención correspondiente a éste compuesto. La preparación se pasó varias veces hasta que se concluyó que en ella existía un porcentaje del mismo: La posibilidad de una contaminación era evidente. Esta podía provenir de una contaminación cruzada durante la preparación del resto de diluciones por negligencias en el pipeteo. No obstante, como prueba, se pasó por el cromatógrafo una dilución únicamente del escualano comercial y se volvió a observar inequívocamente el pico de escualeno (**Fig. 4**).

Estas observaciones llevaron a la conclusión de que el escualano de la casa Sigma Aldrich podía obtener una pequeña porción de escualeno, dado que su pureza era del 99%. El proceso de fabricación de éste producto comercial podría llevarse a cabo por medio de la reducción de escualeno, dejando una pequeña fracción de este último, pero no se encontraron referencias bibliográficas ni revisiones del producto que

hicieran mención ni al proceso de fabricación ni a la porción de escualeno que se observó. También se consideró nuestro stock de escualano puro podría haber sido contaminado durante el manejo y la preparación de muestras que involucraran también escualeno puro comercial.

Fig.7 Cromatograma del punto 0 de la recta



La presencia de una fracción de escualeno en el estándar primario tenía consecuencias dado que se añadía antes de la extracción: Los niveles de escualeno en la muestra se verían incrementados y los datos que se obtuvieran acerca de la concentración y el rendimiento de extracción, basándonos en el estándar interno primario, no serían los reales.

5.1.2 Grupo I: Muestras

En los cromatogramas de las muestras del Grupo I se obtuvieron de nuevo los picos correspondientes a los tres compuestos (Escualano, escualeno y 5alfa-colestando) a unos tiempos de retención similares a los observados durante el paso de las preparaciones de la recta.

No obstante, obtenidos estos cromatogramas, se atendió a un fallo grave: La concentración de escualano que se había añadido a las muestras era demasiado alta. Tras añadir 0,5 ul puros, su concentración en el vial de inyección terminaba en torno a 5 mM y los picos que éste reportaba en el cromatógrafo eran de un tamaño completamente desproporcionado. Ésta saturación de escualano implicaba dos cosas: Por un lado, la contaminación de escualeno que se había reportado en el escualano

podía ocultar completamente el valor de escualeno real de la muestra, de manera que no se podía saber si el escualeno reportado era ni mucho menos el real. Por otro, la recta de interpolación que se había preparado siguiendo el método del estándar interno resultaba inútil: La concentración del escualano en las muestras era en torno a 5 veces más grande que a la que éste mismo figuraba en las preparaciones de la recta, de forma que los valores que se hubieran obtenido por la interpolación hubieran sido fuera de la linealidad e irreales.

También se reportó la aparición de un 4º pico en casi la mayoría de muestras. El tiempo de retención fue de aproximadamente 12,3 minutos, muy próximo al del escualeno, y según reportó el espectrómetro de masas el compuesto se trataba del psi-psi-caroteno. Este compuesto no ha sido descrito en animales por lo que su observación resultó interesante. No fue reportado cuando se pasó únicamente la dilución de escualano puro para reportar la contaminación de escualeno y su origen es un misterio.

Hay que señalar que éste era el primer grupo de muestras con el que se trabajó, por lo que existía un cierto grado de desconocimiento acerca de diferentes aspectos de la metodología. Este lote se consideró un éxito parcial al poder identificar cualitativamente los 3 compuestos de interés vía CG-MS y sirvió para afrontar cambios en el método, que no dejaba de estar en desarrollo.

5.2. Cambios en la metodología inicial

De acuerdo a los resultados obtenidos en el primer estudio, se introdujeron dos cambios en la metodología:

El 5-alfa colestano pasó a ser el estándar interno primario, por lo que se depositaba en el tubo de centrífuga antes de homogeneizar la muestra, donde antes en su lugar se había añadido escualano. La cantidad que se añadía de éste se medía por pesada para calcular exactamente el rendimiento del proceso de extracción.

Por otro lado, el escualeno pasó a ser el estándar interno secundario con el que se calcularía la eficacia de la inyección y detección del CG-MS. Este se añadió disuelto en el diclorometano que se usaba para resuspender las muestras tras llevarlas a sequedad para pasarlas por el cromatógrafo. Además la cantidad que se añadió de éste fue cuatro veces menor a la que se había añadido en el primer estudio. De esta manera se obtuvo una señal proporcional del mismo y se redujo el ruido de las mediciones y la alteración de los datos reales provocada por la contaminación del escualano con escualeno.

El resto del método permaneció invariable. Las muestras fueron extraídas y preparadas en lotes de 6 muestras de la misma forma que en la metodología original (a excepción de los cambios mencionados) y se pasaron por el cromatógrafo bajo las mismas condiciones.

De igual manera, se volvió a preparar una recta de calibrado similar a la primera pero con concentraciones reducidas de los estándares internos (Escualeno=2,2 mM, 5alfa=1,05 mM).

5.3. Estudios grupos II Y III

5.3.1. Nueva recta

Para el análisis muestral de ambos grupos se decidió tomar solo los puntos de la nueva recta que estaban en el intervalo de concentraciones en las que se esperaba el escualeno en la muestra (los tres primeros). Entre estos se observó una buena linealidad con un índice de regresión lineal correcto: **Anexo 8.1.**

Las preparaciones para el establecimiento de la recta se pasaban por el cromatógrafo cada vez que se pasaba un lote de muestras, dado que había que tener en consideración las variaciones inter-día de las mediciones en el aparato. En total las preparaciones de esta segunda recta se pasaron dos veces, una por cada grupo de muestras.

Dado que eran las mismas preparaciones, la recta no experimentaba grandes variaciones pero estas debían tener en cuenta para el cálculo de las concentraciones y el rendimiento. La recta recogida en el Anexo 8.1.1. (2.1) es la correspondiente a la recta calculada para el Grupo II de muestras.

5.3.2. Grupo II: Cromatogramas

a. Ratones Wildtype: Se observó la aparición de los mismos picos del escualano (t=11,2), escualeno (t=12,6) y 5-alfa colestano (t=13,3) que habían sido identificados en las muestras anteriores. Se observaron altos valores del área del pico de escualeno en algunos de los ratones alimentados con una dieta suplementada en éste compuesto (1g/kg), no así en los ratones alimentados con dieta control. También se observó de nuevo la aparición del pico correspondiente al Psi-Psi-caroteno en los mismos ratones que habían seguido la dieta suplementada con escualeno y mostraban un alto contenido de éste en la muestra, según el cromatograma.

b. Ratones Knock-out para APOA1: Las muestras de los ratones KO para ApoA1 presentaron todas ellas un pico de escualeno mínimo, similar al obtenido en los ratones WT de dieta control. No obstante, tampoco se observaron grandes picos de escualeno en ninguno de los ratones de con éste genotipo que había seguido la dieta enriquecida con escualeno, a diferencia de los WT. El pico de escualeno en estos cromatogramas, al igual que el observado en las muestras control, podría tener su origen en la no-pureza del escualano. Los nulos niveles de escualeno en todas las muestras procedentes de éstos ratones Knock-out tendría su explicación en la carencia

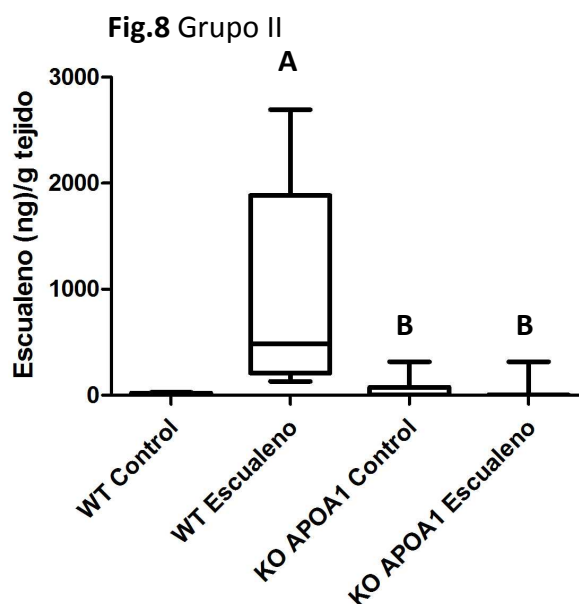
de la proteína APOA1: Ésta proteína tiene un papel fundamental en la internalización del escualeno en el hígado.

Se incluyen cromatogramas representativos de todos los grupos de muestras en el **Anexo 8.2**.

5.3.3. Grupo II: Análisis estadístico

Haciendo uso de la recta 2.1, se calcularon las concentraciones de cada muestra, las cuales se corrigieron teniendo en cuenta el rendimiento individual de cada extracción (Éste último se calculó comparando la concentración obtenida del estándar interno primario a partir de su área con la concentración a la que figuraba en la muestra). A partir de la concentración real de escualeno se calcularon los nanogramos de éste compuesto por gramo de tejido para cada muestra.

El gráfico adjunto (**Fig. 8**) corresponde a la representación de la cantidades de escualeno (ng) por gramo de tejido calculadas de manera individual y agrupadas las 4 clases de ratones del Grupo II: Ratones WT con dieta Chow (**WT control**), ratones WT con dieta Chow suplementada con 0,50 mg/kg de escualeno (**WT Escualeno**), ratones KO APOA1 con dieta Chow (**KO APOA1 Control**) y ratones KO APOA1 con dieta suplementada con 0,50 mg/kg de escualeno (**KO APOA1 Escualeno**).



Se realizó un análisis estadístico para evaluar la respuesta dietética al escualeno usando ANOVA de una vía con un post-test de Mann-Whitney con una cola. Se reportaron diferencias muy significativas: **A**, $P < 0,001$ vs WT control, y **B** $P < 0,0001$ vs WT Escualeno.

El rendimiento global medio de la extracción osciló entre el **30%** y el **95%**. Se observaron variaciones entre los grupos muy significativas.

5.3.4. Grupo III: Cromatogramas

Se volvieron a observar los tres picos correspondientes al escualeno, escualano y 5alfa en todas las muestras (incluida las muestras control). Dentro de los dos grupos con dieta suplementada había variaciones muy significativas entre los individuos, presentando varios de ellos grandes picos de escualeno mientras otros presentaban niveles basales similares a los del grupo con dieta control. Esto podría indicarnos que

podría existir una alta variabilidad, habiendo individuos hipo e hiper respondedores al escualeno dietético entre los animales KO para APOE, de manera que esta proteína podría tener implicaciones en el transporte, metabolismo o captación hepática del escualeno. Nuevamente, se volvió a observar el pico del β -caroteno en todas las muestras que presentaban grandes picos de escualeno, tanto en los ratones que habían seguido una dieta suplementada a 0,25 mg/kg o a 1 g/kg.

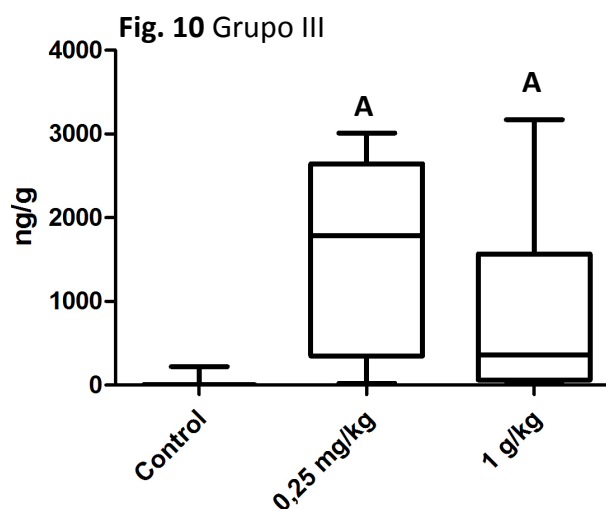
Se pueden consultar cromatogramas representativos de este grupo en el **Anexo 8.3**.

5.3.5. Grupo III: Análisis estadístico

Como adelantábamos en el punto 5.3.1., para el cálculo de las concentraciones de escualeno en este grupo se volvió a establecer una recta (2.2) con las mismas preparaciones y de la misma forma que la otra (2.1): Anexo 8.1.2.

Nuevamente, se usó la fórmula obtenida para calcular la concentración de escualeno de las muestras a partir de las áreas de los cromatogramas. Estas se corrigieron teniendo en cuenta el rendimiento individual de cada una y a partir de las concentraciones corregidas se calcularon los ng de escualeno por gramo de tejido.

El gráfico adjunto (**Fig. 10**) corresponde a la representación de la cantidades de escualeno (ng) por gramo de tejido calculadas de manera individual y agrupadas los 3 subgrupos de ratones del Grupo III: Ratones KO APOE con dieta Chow (**Control**), ratones KO APOE con dieta Chow suplementada con 0,25 mg/kg de escualeno (**0,25 mg/kg**) y ratones KO APOE con dieta Chow suplementada con 1g/kg de escualeno (**1g/kg**).



De nuevo, se usó un ANOVA de una vía con un post-test de Mann-Whitney con una cola. Se volvieron a reportar diferencias muy significativas: **A**, $P < 0,001$ vs Control.

El rendimiento global medio de la extracción fue del **88,92 %**.

5.4. Nueva mejora de la metodología y establecimiento de parámetros analíticos

Tras la consideración de los resultados obtenidos, de cara a la agilización y mejora en la exactitud del método, el establecimiento de los parámetros analíticos y la preparación de nuevas muestras en el futuro, se introdujeron nuevos cambios en la metodología: Los estándares internos se añadirían con jeringas de vidrio Hamilton, lo

que aseguraría la exactitud del volumen. De esta manera no habría necesidad de realizar pesadas individuales para cada estándar y se mejoraría la precisión, facilitando el trabajo en el laboratorio.

La nueva metodología se utilizó para la preparación de las muestras destinadas al cambio de la metodología: Para ello se pesaron aproximadamente 1,2 gramos de hígado de ratón, se homogeneizaron y el homogeneizado se separó en 2 partes iguales (0,6058g y 0,6061g). La preparación de 0,6058g se dopó con escualeno comercial hasta una concentración de 2 mM, mientras que la otra se dopó hasta 0,2 mM. Después se separó cada una en tres partes iguales (seis muestras en total, 3 dopadas a 2 mM y 3 a 0,2 mM) y se le añadió el diclorometano (Estándar interno primario) con la pipeta Hamilton. A partir de aquí se siguieron los protocolos de extracción de la metodología original. Llegada la preparación de las muestras para el cromatógrafo, las muestras se resuspendían en un stock de diclorometano con escualeno de nuevo con una pipeta Hamilton. La cantidad exacta de stock en el que se resuspendían sí que se medía por pesada en la balanza de precisión para después calcular la cantidad exacta del diclorometano y la concentración de los estándares.

Siguiendo esta metodología se preparó una la nueva recta que constaba de 3 puntos extras superiores a la recta 4. Con esta se recta se pretendía constatar la linealidad y el límite superior del método.

5.5. CG-MS: Cambio de equipo

Las preparaciones y muestras para el establecimiento de los parámetros analíticos se pasaron por un cromatógrafo de gases-masas modelo AGILENT-6890N Network CG System/AGILENT-5975B inertXL EI/CI MSD. El cambio de equipo se debió a una avería del que veníamos usando. Las nuevas condiciones del proceso trataron de conservarse lo máximo posible:

- Columna: HP-5ms ULTRA INERT – GCMS Column Agilent 19091S – 433 UI 30m x 250um x 0.25um.

- Condiciones de la columna:

Tª	Rate	Hold	Total
100 °C		5	5
280 °C	60	10	18

- Inyección: 300°C

- Muestra: 1uL autosampler. Split 1-60"

5.6. Parámetros analíticos

5.5.1. Linealidad

Por condiciones que achacamos al cambio de equipo, la linealidad de la nueva recta solo llegó hasta la quinta preparación. Por ello se tomaron solo los 5 primeros puntos para establecer las rectas de interpolación para el cálculo de la concentración de escualeno con respecto a los dos estándares internos: **Anexo 8.3: Recta Parámetros Analíticos**

5.5.2. Límite de detección

Para nuestro caso, la muestra del blanco que servía de punto 0 para la recta se pasó un total de 10 veces y el LD se situó en torno a **0,02024 mM**

5.5.3. Límite de cuantificación

Tomando nuevamente el punto 0 de la recta como el blanco, en nuestro caso se situó en **0,02339 mM**

5.5.4. Repetibilidad

La repetibilidad se calculó siguiendo la siguiente fórmula

$$s_f = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^2 (x_{ij1} - x_{ij2})^2}{4 I}}$$

Donde I es el número de días (1), j el número de series analíticas (2), x_{ij1} es el resultado (concentración) para el replicado 1 de la serie j el día i y x_{ij2} el resultado para el replicado 2 de la serie j el día i.

La repetibilidad calculada (% n=6) fue del **4,22%**, considerando un valor aceptable para la técnica.

6. Conclusiones

Las conclusiones de este trabajo fin de grado son:

1. Tanto el procesamiento de muestras biológicas como la cuantificación de escualeno en hígado de ratón por CG-MS fue optimizado con límite de cuantificación de 9,6 ng de escualeno por gramo de hígado (0,02 mM), partiendo de una muestra de 0,1 gramo de hígado.
2. Se ha observado que la suplementación con escualeno dietético en animales wild type, ha producido un incremento muy significativo en la acumulación hepática del compuesto.
3. Los animales carentes de la Apolipoproteína A1 alimentados con dieta enriquecida en escualeno, no han acumulado el compuesto en el hígado, por lo que dicha apolipoproteína estaría implicada en la internalización del compuesto en el hígado.
4. En animales carentes de la Apolipoproteína E alimentados con dieta enriquecida en escualeno durante un periodo de 12 semanas, han acumulado el compuesto en el hígado para las dosis de 0,25 y 1 gramo de escualeno por kilo de peso vivo y día.
5. Se ha identificado un nuevo compuesto en la mayoría de los animales que recibieron una dieta enriquecida en escualeno, el psi-psi-caroteno. Hasta ahora, este compuesto sólo se había descrito en el reino vegetal.

The final conclusions of this project are:

1. *The processing of biological samples as well as the quantification of squalene in mouse liver by GC-MS was optimized. The limit of quantification was 9,6 ng of squalene per gram of liver, starting from a 0,1 gram sample.*
2. *It has been observed that the squalene dietary supplementation in Wild Type animals produce a significant increase in hepatic accumulation of this compound.*
3. *Knock Out animals for Apolipoprotein A1 with squalene enriched diet didn't shown accumulated squalene in the liver. Apolipoprotein A1 maybe is involved in the internalization of this compound in the liver.*
4. *Knock-Out Apolipoprotein E animals feeded whit squalene enriched diet for a period of 12 weeks shown this compound accumulated in the liver.*
5. *A new compound was identified in the samples of most of the animals which received a squalene enriched diet, the psi-psi-carotene. This compound has only been described in the plant kingdom.*

7. Bibliografía

- Baldioli, M., Servili, M., Perretti, G. and Montedoro, G. (1996). Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *J Am Oil Chem Soc*, 73(11), pp.1589-1593.
- Goodman, D. (1964). Squalene in Human and Rat Blood Plasma*. *Journal of Clinical Investigation*, 43(7), pp.1480-1485.
- HELLER, J., HELLER, M., SPRINGER, S. and CLARK, E. (1957). Squalene Content of Various Shark Livers. *Nature*, 179(4566), pp.919-920.
- Liu, G., Ahrens, E., Schreibman, P., Samuel, P., McNamara, D. and Crouse, J. (1975). Measurement of cholesterol synthesis in man by isotope kinetics of squalene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(11), pp.4612-4616.
- Miettinen, T. (1969). Serum squalene and methyl sterols as indicators of cholesterol synthesis. *Life Sciences*, 8(14), pp.713-721.
- Ortega, R. (2006). Importance of functional foods in the Mediterranean diet. *Public Health Nutrition*, 9(8A).
- RAJARATNAM, R., GYLLING, H. and MIETTINEN, T. (1999). Impaired postprandial clearance of squalene and apolipoprotein B-48 in post-menopausal women with coronary artery disease. *Clinical Science*, 97(2), p.183.
- Ramírez-Torres, A., Gabás, C. and Barranquero, C. (2011). Squalene. New York: Nova Biomedical Books.
- Relas, H., Gylling, H. and Miettinen, T. (2000). Dietary squalene increases cholesterol synthesis measured with serum non-cholesterol sterols after a single oral dose in humans. *Atherosclerosis*, 152(2), pp.377-383.
- Relas, H., Gylling, H., Rajaratnam, R. and Miettinen, T. (2000). Postprandial Retinyl Palmitate and Squalene Metabolism Is Age Dependent. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 55(11), pp.B515-B521.
- Simonen, P., Gylling, H. and Miettinen, T. (2007). The distribution of squalene and non-cholesterol sterols in lipoproteins in type 2 diabetes. *Atherosclerosis*, 194(1), pp.222-229.
- Strandberg, T., Tilvis, R. and Miettinen, T. (1981). Squalene and Sterol Synthesis in Isolated Small-Intestinal Cells of the Rat. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 16(6), pp.801-810.
- Tilvis, R., Kovanen, P. and Miettinen, T. (1978). Release of newly synthesized squalene, methyl sterols and cholesterol from human adipocytes in the presence of lipoproteins. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 38(1), pp.83-87.
- Visioli, F. and Galli, C. (1997). Antioxidant and other biological properties of olive oil polyphenols. *Atherosclerosis*, 135, p.S6.
- Tilvis RS, Kovanen PT, Miettinen TA. Metabolism of squalene in human fat cells. Demonstration of a two-pool system. *J. Biol. Chem.* 1982 Sep 10;257(17):10300-5
- Tilvis, R. and Miettinen, T. (1982). Fate of intravenously administered squalene in the rat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 712(2), pp.374-381.
- Buddhan, S., Sivakumar, R., Dhandapani, N., Ganesan, B. and Anandan, R. (2007). Protective effect of dietary squalene supplementation on mitochondrial function in liver of aged rats. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 76(6), pp.349-355.

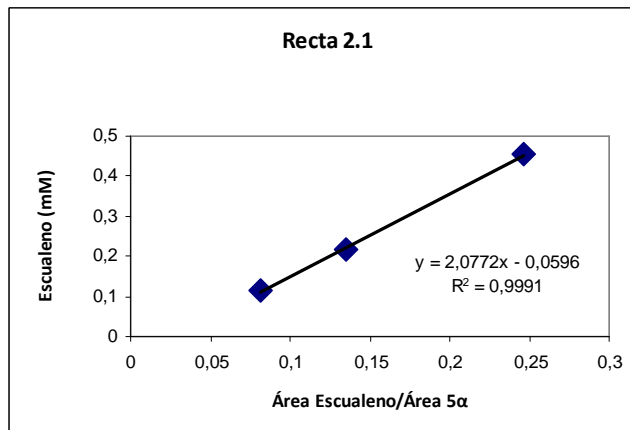
- Huang, Z., Lin, Y. and Fang, J. (2009). Biological and Pharmacological Activities of Squalene and Related Compounds: Potential Uses in Cosmetic Dermatology. *Molecules*, 14(1), pp.540-554.
- Moreno, J. (2003). Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW 264.7. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(9), pp.1073-1081.
- Yasunari, K., Maeda, K., Minami, M. and Yoshikawa, J. (2001). HMG-CoA Reductase Inhibitors Prevent Migration of Human Coronary Smooth Muscle Cells Through Suppression of Increase in Oxidative Stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21(6), pp.937-942.
- Lanzón, A., Guinda, A., Albi, T. and De la Osa, C. (1995). Método rápido para la determinación de escualeno en aceites vegetales. *Grasas y Aceites*, 46(4-5), pp.276-278.
- Matsuura, H., Watanabe, M. and Kaya, K. (2012). Squalene Quantification Using Octadecylbenzene as the Internal Standard. *Procedia Environmental Sciences*, 15, pp.43-46.

8. Anexos

8.1. Anexo: Recta 2

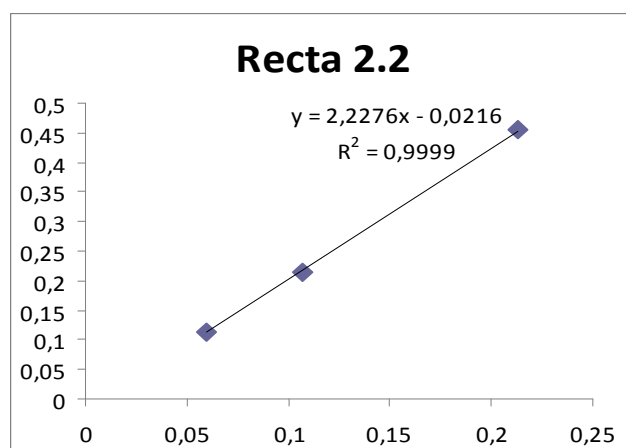
8.1.1. Recta 2.1

x	y
Área E/Área 5α	Escualeno (Mm)
0,246438152	0,454241004
0,135346529	0,215724231
0,081159803	0,112938243



8.1.2. Recta 2.2

x	y
Área E/Área 5α	Escualeno (mM)
0,454241004	0,21337214
0,215724231	0,10726774
0,112938243	0,05987198



8.2. Anexo: Cromatogramas representativos del Grupo II

8.2.1. Ratones Wildtype

Fig. 11 Ratón 4388-Dieta suplementada con escualeno (50mg/kg)

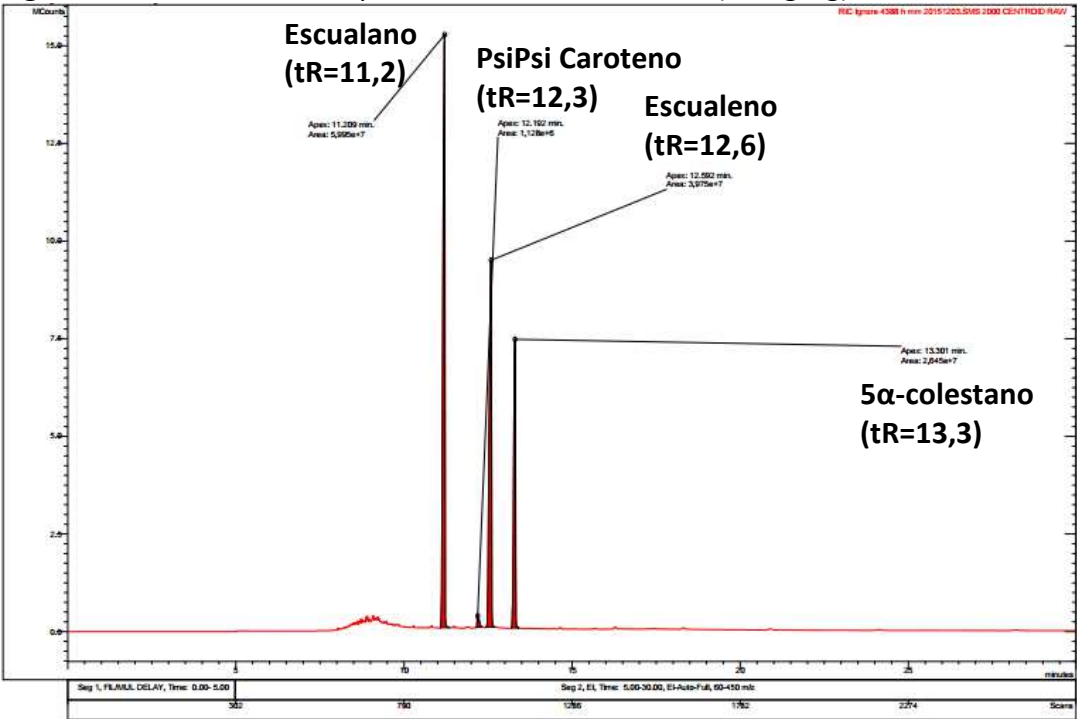
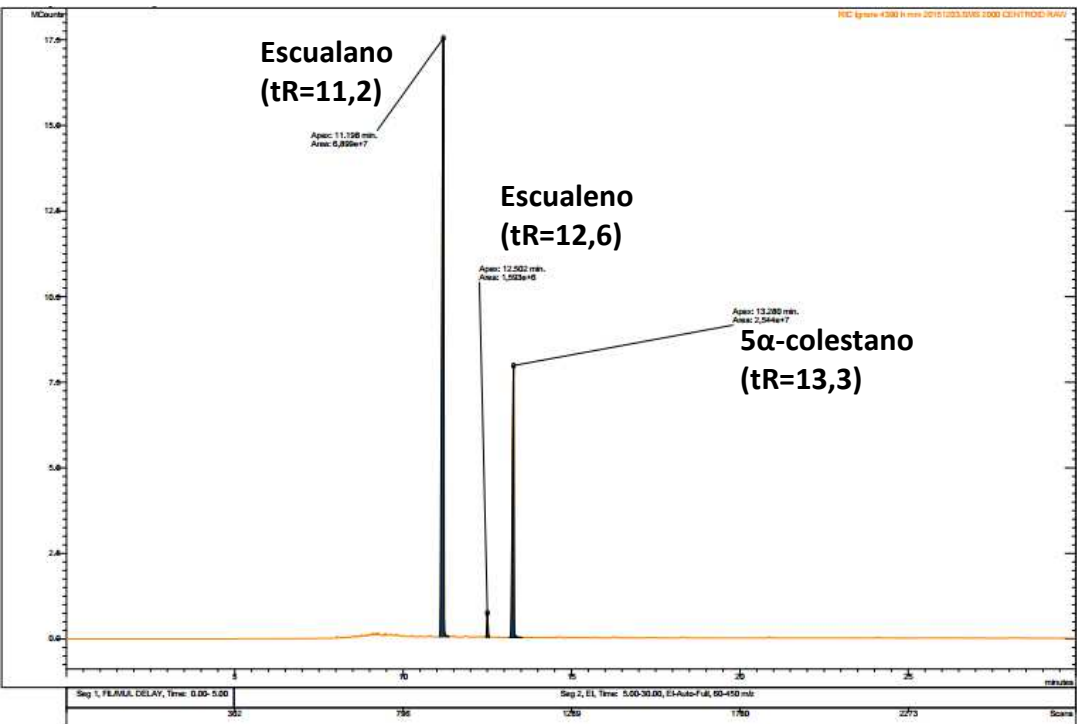


Fig. 12 Ratón 4390-Dieta control



8.1.2. Ratones KO-APOA1

Fig. 13 Ratón 4705-Dieta suplementada con escualeno (50 mg/kg)

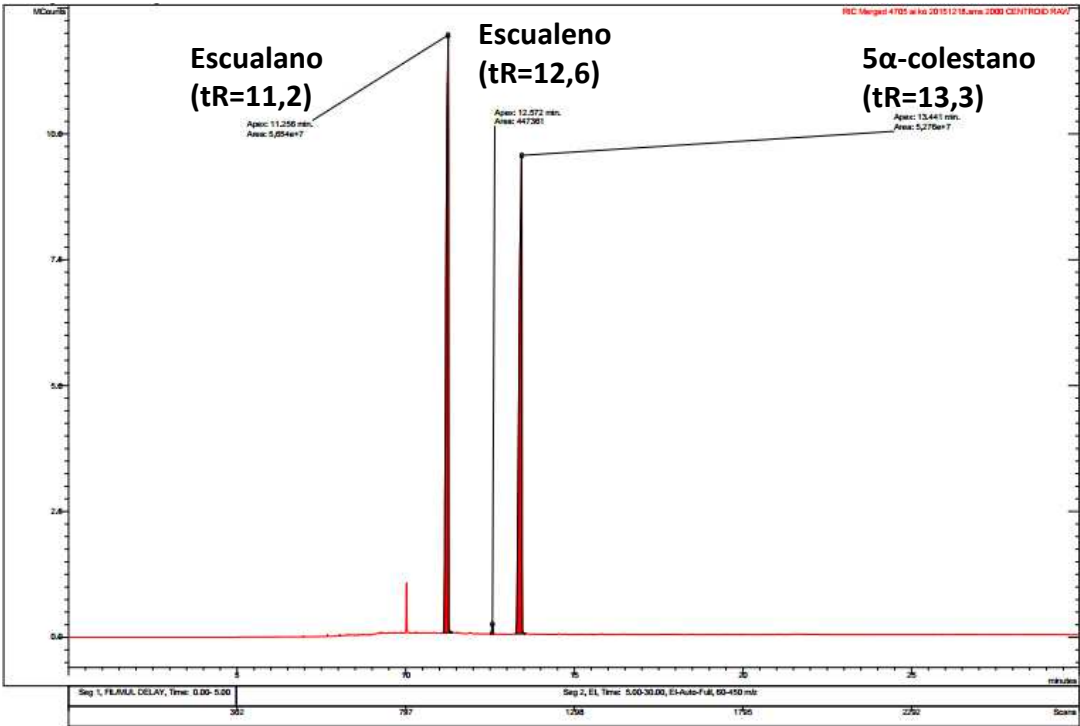
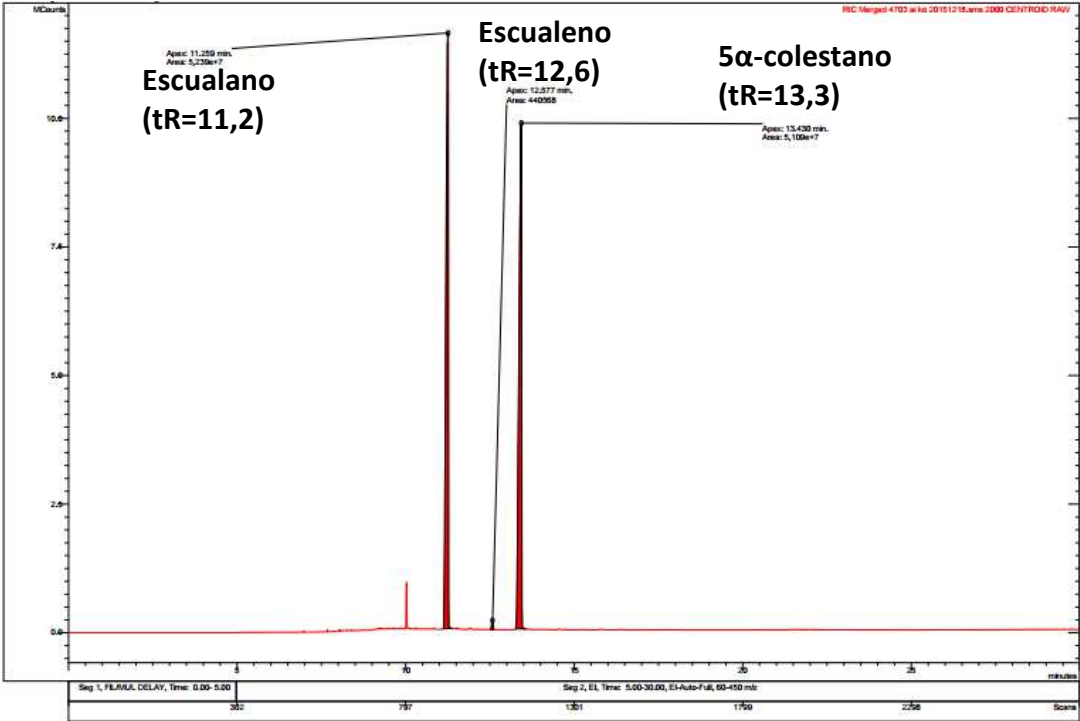


Fig. 14 Ratón 4703-Dieta control



8.2. Anexo: Cromatogramas representativos del grupo III

Fig. 15 Ratón 1638-Dieta control

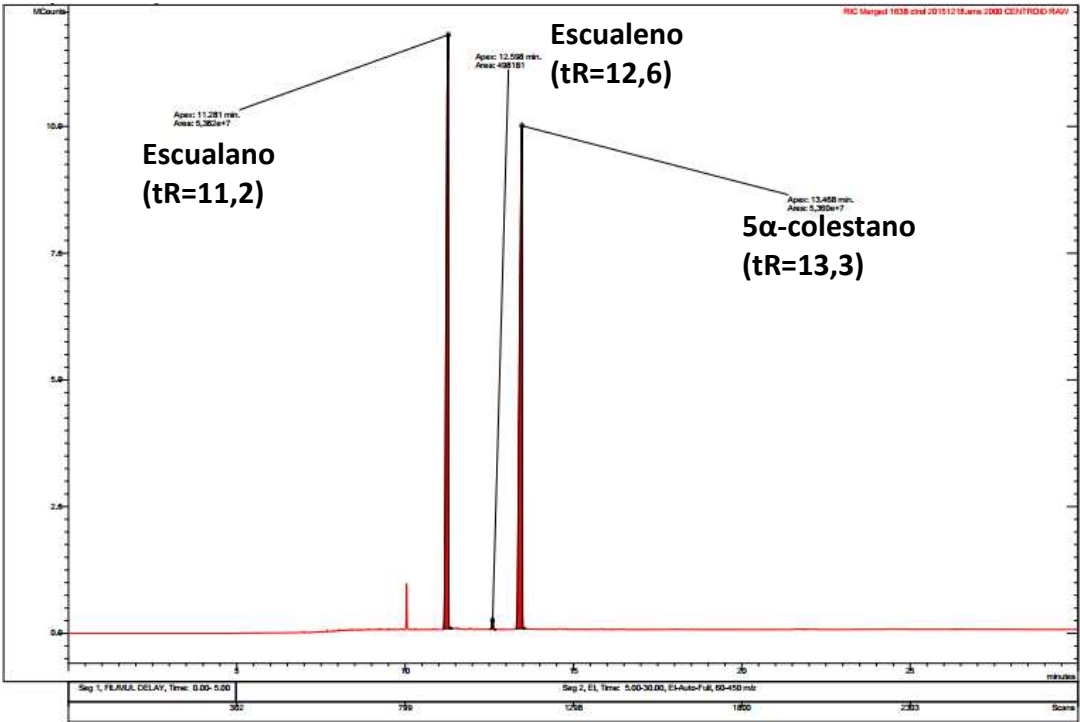


Fig. 16 Ratón 1677-Dieta suplementada con 0,25 mg/kg

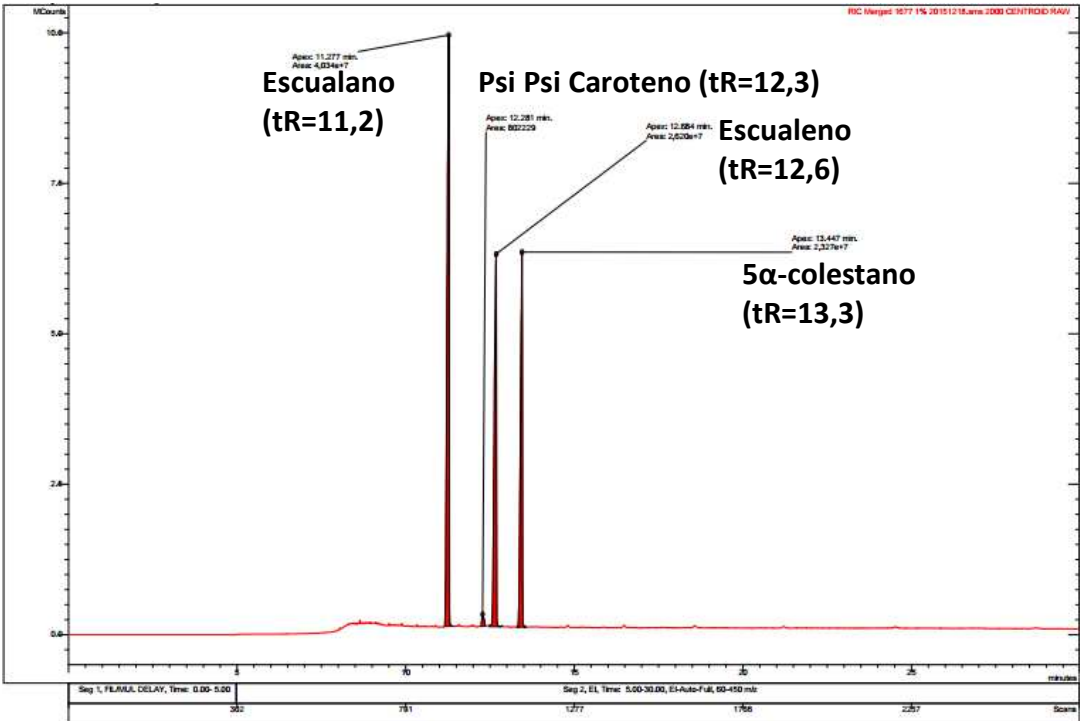
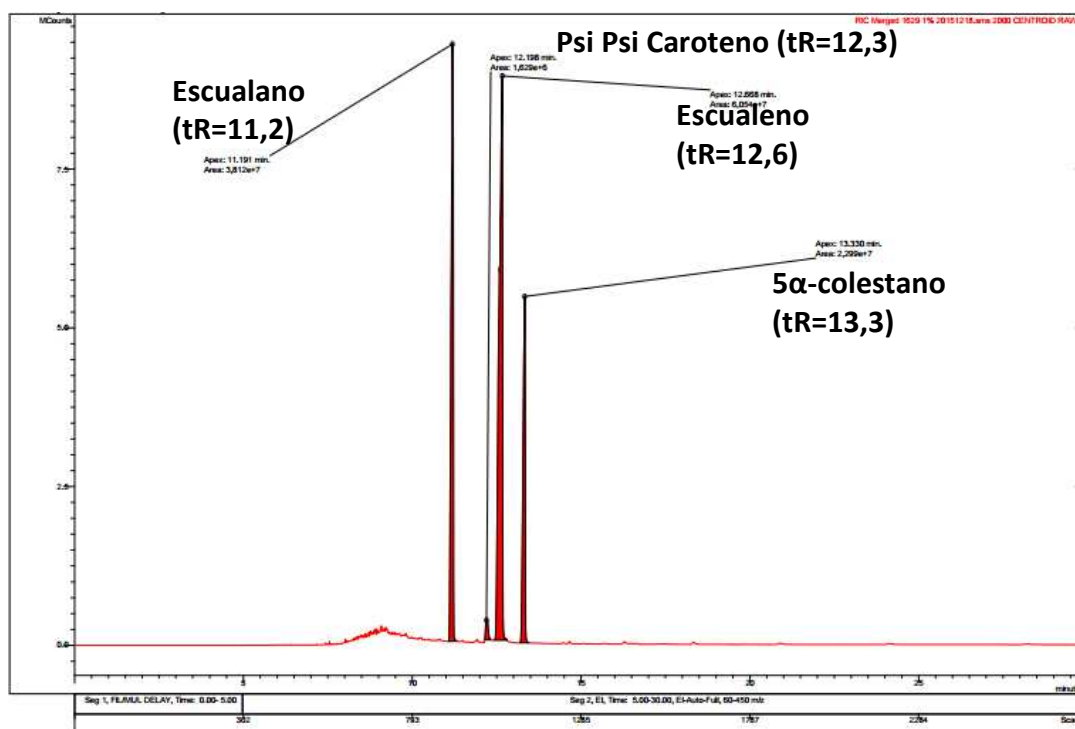


Fig. 17 Ratón 1629-Dieta suplementada con 1g/kg



8.3. Anexo: Recta parámetros analíticos

y	x
Escualeno (mM)	Área E/Área 5α
0,0896	0,3472
0,1628	0,6126
0,3156	1,2536
0,6272	2,6915
1,2679	5,7686

